

Dépistage du paludisme: Quel est l'apport de la biologie moléculaire ?

Malaria screening: what is the contribution of molecular biology ?

Sameh Belgacem^{1,2}, Mohamed Bettaieb², Najoua Houas², Saoussen Chouchène³, Maha Mastouri^{1,4}, Hamouda Babba²

1. Laboratoire de Microbiologie, CHU Fattouma Bourguiba, Monastir, Tunisie.
2. Laboratoire de recherche de Parasitologie – Mycologie Médicale et Moléculaire (LR12ES08), Faculté de pharmacie de Monastir, université de Monastir, Tunisie.
3. Laboratoire de recherche génome humain et maladies multifactorielle (LR12ES07), Faculté de pharmacie de Monastir, université de Monastir, Tunisie.
4. Laboratoire de recherche Maladies Transmissibles et Substances Biologiquement Actives (LR99ES27) Faculté de pharmacie de Monastir, université de Monastir, Tunisie.

RÉSUMÉ

Introduction: L'examen microscopique est la méthode de référence pour le diagnostic du paludisme selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Cependant, les performances de cet examen dépendent de l'expérience du microscopiste et du taux de la parasitémie. Ainsi, la recherche de l'ADN plasmodial pourrait être une technique alternative.

Objectif: évaluer l'apport de la biologie moléculaire dans le dépistage du paludisme d'importation.

Méthodes: Il s'agissait d'une étude descriptive, prospective, incluant tous les étudiants, de la région de Monastir, étrangers, originaires des pays endémiques pour le paludisme. La période d'étude était de septembre 2020 à avril 2021. Chaque sujet a bénéficié du dépistage du paludisme par trois méthodes : recherche microscopique direct de Plasmodium, recherche des antigènes plasmodiaux, recherche de l'ADN plasmodial par PCR nichée. L'espèce plasmodiale a été déterminée par séquençage.

Résultats: Parmi les 127 sujets dépistés, un seul avait un examen microscopique positif à Plasmodium falciparum. Parmi les 126 sujets ayant un examen microscopique négatif, douze étudiants avaient un résultat de PCR nichée positif soit 9,5%. Le séquençage moléculaire a permis l'identification de dix isolats de Plasmodium falciparum, un Plasmodium malariae et un Plasmodium ovale. Notre étude a montré que les résultats de la PCR nichée étaient en accord avec ceux de la microscopie à 90,6% des cas.

Conclusion: la PCR nichée semble plus sensible pour la détection des faibles parasitémies. D'où l'importance d'inclure la biologie moléculaire comme un outil de dépistage du paludisme pour garantir une meilleure détection des cas importés.

Mots clés: Plasmodium, Programmes de dépistage diagnostique, Biologie moléculaire Microscopie, Tunisie

ABSTRACT

Introduction: According to the World Health Organization, Microscopy is the gold standard for diagnosing malaria. However, the performance of this examination depends on the experience of the microscopist and the level of parasitemia. Thus, molecular biology detection of malaria could be an alternative technique.

Aim: evaluate the contribution of molecular biology in detecting imported malaria.

Methods: This was a descriptive, prospective study, including all students, from the Monastir region, and foreigners, from countries endemic to malaria. The study period was from September 2020 to April 2021. Each subject was screened for malaria by three methods: direct microscopic detection of Plasmodium, detection of plasmodial antigens, and detection of plasmodial DNA by nested PCR.

Results: Among the 127 subjects screened, only one had a positive microscopic examination for Plasmodium falciparum. Among the 126 subjects with a negative microscopic examination, twelve students had a positive nested PCR result, i.e. 9.5%. Molecular sequencing allowed the identification of ten isolates of Plasmodium falciparum, one Plasmodium malariae and one Plasmodium ovale. Our study showed that the results of nested PCR agreed with those of microscopy in 90.6% of cases.

Conclusion: Nested PCR seems more sensitive for the detection of low parasitemias. Hence the importance of including molecular biology as a malaria screening tool to ensure better detection of imported cases.

Key words: Plasmodium, Diagnostic Screening Programs, Molecular Biology, Microscopy, Tunisia

Correspondance

Sameh Belgacem

Laboratoire de Microbiologie unité de Parasitologie, CHU Fattouma Bourguiba, 5000, Monastir, Tunisie.

Email: Belgasam1503@yahoo.fr

INTRODUCTION

En Tunisie, le programme national d'éradication du paludisme a été couronné de succès depuis que le dernier cas de paludisme autochtone a été signalé en 1978 (1). Malgré ce succès, le paludisme reste une préoccupation des autorités sanitaires car il existe un risque permanent de réintroduction de l'endémie paludéenne (1). Le dépistage actif des étudiants étrangers a été instauré de manière systématique en 1984 (2). Un diagnostic précis de l'infection à palustre est primordial pour bien surveiller et détecter tout porteur de parasite. Il faut accorder, par conséquent, une attention particulière aux infections asymptomatiques et infections à faible densité de parasites qui restent parfois indétectables et seront par suite responsables de la réapparition de la maladie. Le diagnostic du paludisme se fait traditionnellement par examen microscopique des frottis sanguins. La fiabilité de ce test nécessite une expérience que tous les biologistes n'ont pas (3). La conséquence est que certains sujets sont diagnostiqués faussement négatifs, particulièrement lorsque la parasitémie est faible, ce qui est souvent le cas des sujets étrangers. Au cours des dix dernières années, des techniques d'amplification d'acides nucléiques très sensibles et spécifiques ont été développées pour le diagnostic du paludisme (4). Le rôle de la PCR dans le diagnostic du paludisme importé reste une question d'actualité. Notre travail consiste à évaluer l'apport de la technique PCR nichée dans le dépistage du paludisme chez les étudiants étrangers originaires des régions impaludées.

MÉTHODES

Type d'étude, lieu et période d'étude

Il s'agissait d'une étude descriptive, prospective et monocentrique, effectuée au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicale et Moléculaire (LR12ES08) de la Faculté de Pharmacie de Monastir et au Laboratoire de Microbiologie unité de Parasitologie du CHU Fattouma Bourguiba de Monastir. Cette étude s'est étalée sur une période allant du mois de septembre 2020 au mois d'avril 2021.

Population d'étude

Ont été inclus tous les étudiants inscrits dans des établissements universitaires de la région de Monastir, non-résidents permanents en Tunisie, originaires de l'Afrique subsaharienne (Niger, Gabon, Cameroun, Tchad, Congo, Malie, Burkina Fasso) ou de Mauritanie. Ces étudiants ont bénéficié d'un dépistage systématique du paludisme, à leurs inscriptions universitaires, dans le cadre du programme national de surveillance du paludisme.

Tout étudiant non-résident permanent en Tunisie et ayant une symptomatologie évocatrice du paludisme y compris la fièvre a été exclu de cette étude.

Méthodes

Collecte des données

Pour chaque étudiant inclus dans cette étude, les renseignements (le genre, l'âge, l'origine géographique, l'établissement d'étude, le niveau d'étude) ont été recueillis et transcrits sur une fiche de renseignement préétablie.

Type du prélèvement

Chaque sujet a bénéficié d'un prélèvement sanguin, par ponction veineuse périphérique sur tube contenant l'anti-coagulant EDTA. Ce prélèvement a fait l'objet d'un examen microscopique et d'une recherche des antigènes plasmodiaux. Un aliquot de 500µl de sang total a été conservé à -20°C pour l'étude moléculaire.

Examen microscopique

La recherche microscopique de *Plasmodium* spp. a été réalisée par l'examen d'un frottis sanguin coloré par le May-Grünwald Giemsa et d'une goutte épaisse colorée par Giemsa diluée dans de l'eau tamponnée.

Recherche des antigènes par TDR

La recherche des antigènes plasmodiaux a été réalisée par immuno-chromatographie au moyen du kit ABON™ PLUS Malaria (Abon biopharm, China), selon les instructions du fabricant.

Etude moléculaire

L'extraction de l'ADN a été pratiquée en utilisant le kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. L'extrait de l'ADN récupéré a été conservé à -20 °C.

Pour la détection moléculaire du paludisme, nous avons utilisé la méthode « PCR nichée », en se référant aux travaux de Steenkeste et al (4). Elle se fait en deux temps. La première amplification était réalisée avec la paire d'amorces GCDW2 (3'-CGGTCCGCTCCGGTAGCGTCTAATGCCTAGACGTATTCTGATTATCCAG-5') et GCDW4 (3'-CGCATCACCTCTGGG CCGCGTGTGTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG5') ciblant le gène du cytochrome b. Ce dernier possède une spécificité pour toutes les espèces de *Plasmodium* humaines. Pour la première réaction d'amplification, un volume de 10 µl d'AND a été additionné à un volume final de 50 µl du mélange réactionnel. Ce mélange contenait des dNTP (Invitrogen®) à 0,2 mM, le premier couple d'amorces à 0,5 pmol/µl, le MgCl₂ à 2 mM et la Taq polymérase (GoTaq®, Promega) 0,5 U avec son tampon une fois concentré. Chaque réaction d'amplification a été contrôlée par un témoin négatif qui était de l'eau distillée stérile et un témoin positif. Nous avons choisi comme témoin positif un prélèvement positif à *Plasmodium falciparum* détecté par examen microscopique avec une parasitémie égale à 2%.

L'amplification était conduite dans le thermocycleur Gene Touch® (Bioer, Chine) selon le programme suivant : une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, 40 cycles d'amplification (94 °C pendant 30 s, 50 °C pendant 30s et 72 °C pendant 1 min) et une élévation finale à 72 °C pendant 5 min.

Au cours de la deuxième réaction de la PCR nichée, une deuxième paire d'amorces PLAS1 (3'-GAGAATTATGGAGTGGATGGTG-5') et PLAS2 (3'TGGTAATTGACATCCAATCC-5') a été utilisée. Un volume 10 µl du produit de la première PCR, après dilution au 1/10ème dans l'eau distillée a été additionné à un volume final de 50 µl du mélange réactionnel. Les concentrations du mélange réactionnel, le protocole et le programme d'amplification étaient les mêmes que ceux de la première réaction de la PCR nichée. Les produits de PCR étaient contrôlés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant 0,25 µg/ml de bromure d'éthidium. La taille de l'amplifiat était estimée de 1253pb, pour la première réaction d'amplification et de 815pb la deuxième réaction d'amplification.

L'espèce plasmodiale a été déterminée par séquençage par la méthode de Sanger. Les produits de PCR ont été envoyés à une plate-forme de séquençage (BIOfidal, France). Les séquences ont été éditées en utilisant le programme BioEdit 7.2. Les séquences obtenues ont été comparé à la base des données nucléotidique de la NCBI (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Détermination du seuil de la détection

Nous avons utilisé un ancien prélèvement sanguin, positif à Plasmodium falciparum avec une charge parasitaire de 3.107 parasite/ml. A partir de ce prélèvement, une série de dilution en cascade, au 1/10ème, a été réalisé dans de l'eau physiologique stérile à 0,9%, tout en assurant une homogénéisation soignée à chaque étape.

Pour chaque dilution, une extraction a été réalisée par les kits d'extraction en essai. Pour la détermination du seuil de la détection, on a appliqué le même protocole indiqué précédemment.

Analyse des résultats

L'ensemble des données recueillies ont été codées puis saisies pour analyse statistique en utilisant le logiciel SPSS (Statistique Package for Social Sciences) version 21. Les variables qualitatives ont été exprimées en nombre et en pourcentage et les variables quantitatives en moyenne± écart type.

RÉSULTATS

Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

Cent vingt-sept étudiants ont été inclus dans notre étude, le sex-ratio H/F était de 1,8. La moyenne d'âge était de 22 ans avec un écart type de 4,9 ans. Le trois-quarts des sujets étaient inscrits dans des établissements publics dépendant du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. Vingt-sept sujets suivaient des formations professionnelles dans des centres privés et 28 sujets appartenaient à des établissements universitaires privés. La majorité des sujets (82,5%) étaient inscrits en première année d'étude. Trente un pourcent des sujets étaient mauritaniens, 20,6 % provenaient du Gabon et

15,9 % étaient originaire de Côte- d'Ivoire.

Détermination du seuil de détection de la PCR nichée

Le seuil de détection de la première réaction de PCR en utilisant le kit d'extraction d'ADN QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Allemagne) et la Taq polymérase GoTaq® (Promega, USA) était égale à 300 parasite/ml. Pour la deuxième réaction de PCR nichée, le seuil de détection était égal à 30 parasite/ml.

Résultat du dépistage du paludisme

Parmi les 127 étudiants dépistés à la recherche du paludisme, un seul sujet était déclaré positif par examen microscopique. Son frottis mince a permis l'identification de l'espèce Plasmodium falciparum, avec une charge parasitaire estimée à 1%. Sa recherche des antigènes plasmodiaux, par kit ABON™ PLUS Malaria, s'avérait positive, avec présence une bande « pf ».

Pour les 126 étudiants ayant un examen microscopique négatif, un seul avait un test rapide positif avec présence d'une bande « pf » de faible intensité.

Sur les 126 étudiants, dont le dépistage microscopique du paludisme était négatif, 12 (9,4%) étudiants avaient une réaction PCR nichée à la recherche de Plasmodium spp. positive.

Notre étude a montré que les résultats de la PCR nichée étaient en accord avec ceux de la microscopie à 90,6% des cas (Tableau et figure 1).

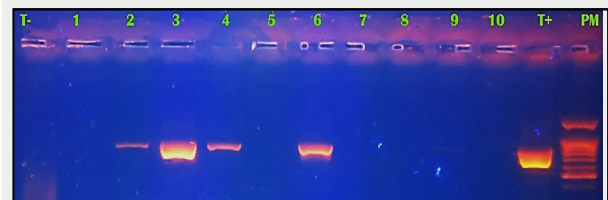


Figure 1. Profil de migration sur gel d'agarose des produits de la PCR nichée pour la détection de Plasmodium

T(+): Témoin positif, T(-): Témoin négatif, puits 1, 5, 7, 8 et 9 : réaction négative, Puits 2, 3, 4 et 6 : réaction positive, PM: marqueur de poids moléculaire 100 pb

Tableau. Comparaison des résultats de la PCR nichée avec ceux de la microscopie lors du dépistage du paludisme chez les étudiants étrangers

Technique	Microscopie		Total	
	Positive	Négative		
PCR nichée	Positive	1 (0,8%)	12 (9,4%)	13(10,2%)
	Négative	0	114(89,8%)	114 (89,8%)
Total		1 (0,8%)	126 (99,2%)	127 (100%)

Le séquençage des isolats détectés a permis l'identification de dix contaminations par l'espèce Plasmodium falciparum, une contamination par l'espèce Plasmodium ovale et une contamination par l'espèce Plasmodium malariae.

Les données démographiques des cas de portage de plasmodium détecté par PCR nichée sont présentées dans la figure 2

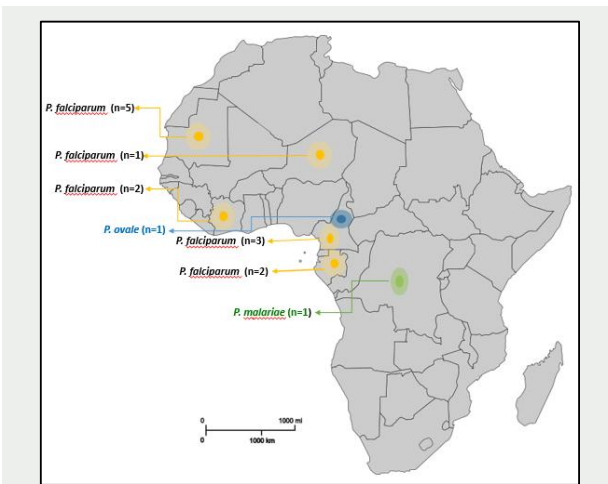


Figure 2. Répartition géographique des espèces de Plasmodium identifiées chez les étudiants étrangers

DISCUSSION

Dans notre étude, la PCR nichée a détecté 12 cas de paludisme (9,5%) alors que leurs dépistages microscopiques, par frottis mince et goutte épaisse, étaient négatifs. La discordance des résultats entre la PCR et l'examen microscopique est liée à une sensibilité plus élevée de la PCR qui peut détecter une densité faible variant de 0,001 à 30 parasite/ μ l (6,7). Selon notre protocole, le seuil de détection de la PCR nichée était estimé à 0,03 parasite/ μ l. Alors qu'une microscopie de qualité ne peut détecter qu'une parasitémie de 10 à 20 parasites/ μ l (8). De ce fait, l'examen microscopique, peut être négatif dans les formes pauci-parasitaires. Outre le faible niveau de parasitémie, chez le sujet infecté, la performance du diagnostic microscopique dépend directement de l'expérience du microscopiste et du temps de lecture. Une étude, menée dans le but d'évaluer la lecture microscopique des frottis mince, a indiqué que pour une densité de 177 000 parasites/ μ l, 5% des biologistes avaient déclaré l'absence de parasite Plasmodium (3).

Notre étude a montré que les résultats de la PCR nichée étaient en accord avec ceux de la microscopie à 90,6% des cas. Ce résultat est inférieur à celui rapporté précédemment en Tunisie par Siala et al. Ces derniers ont évalué le taux de concordance entre l'examen direct et la PCR à 97,5% (9). De même, au Thaïlande, Swan et al., ont rapporté un taux de corrélation entre les deux méthodes de dépistage de 95% (10). Le même taux a été enregistré en Italie en 2012 (11). Nos résultats sont, également, inférieurs à ceux rapportés par Turki et al. en Iran (98,5%) (12). La corrélation enregistrée dans notre travail est supérieure à celle décrite en Birmanie en 2017 (87,3%) (13). Le taux de corrélation trouvé dans notre étude est similaire à ceux trouvés en Ethiopa (90,7%) et en Congo (91,5 %) (14,15).

Les sujets asymptomatiques, dont le dépistage du paludisme est négatif par examen microscopique mais positif par PCR, peuvent être classés comme porteurs de parasites indétectables par microscopie. Les porteurs sains, notamment des formes sexuées, représentent

un risque pour la population lorsque les conditions écologiques de transmission et de réceptivité du parasite sont réunies (16). Néanmoins, une PCR positive n'est pas nécessairement un indicateur de la présence de parasites au stade érythrocytaire, car l'ADN peut provenir de parasites au stade pré-érythrocytaire. De plus, une PCR positive ne permet pas de connaître le stade parasitaire que seul le frottis mince le permet.

La présence d'infestations sub-microscopiques à Plasmodium peut constituer un défi important pour les programmes de lutte contre le paludisme, car ces individus parasités peuvent agir comme réservoirs d'infestation et contribuer à l'infestation des moustiques (17,18). Les porteurs asymptomatiques de Plasmodium peuvent être à l'origine de la réintroduction de la maladie en Tunisie. Ceci est particulièrement facilité par l'existence de l'anophélisme dans notre pays (19). La réapparition du paludisme a été rapportée dans plusieurs régions du monde. Une telle situation a été rapportée particulièrement en Italie Grèce et Turquie (20).

Nous avons montré que *P. falciparum* demeure l'espèce la plus importée (86,6%). Ce résultat rejoint celui de plusieurs études tunisiennes (21–23). La répartition des cas positifs selon le sexe a démontré une prédominance masculine de (93,3%). Celle-ci est proche aux résultats de l'étude de Belhadj S. et al qui ont rapporté une prédominance masculine de 88,4% (21) et de l'étude de Chelaifa M. et al. qui ont rapporté une exclusivité masculine (100%) (22). Ce résultat pourrait être expliqué par la fréquence des activités nocturnes des hommes par rapport aux femmes ce qui les rend plus susceptibles à la piqûre des anophèles vecteurs du paludisme.

L'espèce Plasmodium falciparum reste de loin l'espèce plasmodiale la plus fréquente à l'échelle mondiale. Un tiers des infections à *P. falciparum* provenaient de la Mauritanie, ceci est expliqué par l'endémicité de ce pays pour le paludisme à *P. falciparum* (24).

Il apparaît clairement que la PCR nichée est plus fiable que l'examen microscopique classique pour le diagnostic des infections palustres. Les techniques d'amplification génique semblent très utiles dans la détection des parasitémies submicroscopiques. Ceci est particulièrement intéressant dans les suivis épidémiologiques lors des programmes de contrôle du paludisme. La sensibilité insuffisante des méthodes conventionnelles, pour détecter les faibles densités de parasites, affecterait sans aucun doute les efforts de lutte antipaludique, ce qui rendrait plus difficile la réduction de la transmission. La méthode moléculaire est très prometteuse pour le diagnostic du paludisme submicroscopique et l'identification des espèces, elle peut être appliquée comme outil de suivi efficace pour la surveillance, le contrôle et l'élimination du paludisme. Elle peut, également, être utile dans la détection de mutations liées à la résistance aux médicaments pour orienter la thérapie antipaludique (25).

CONCLUSION

La méthode moléculaire est très prometteuse pour

le diagnostic du paludisme submicroscopique et l'identification des espèces. Elle peut être appliquée comme outil de suivi efficace pour la surveillance, le contrôle et l'élimination du paludisme. Toutefois, ces essais exigent souvent un équipement sophistiqué et sont beaucoup plus coûteux que la microscopie et les tests de dépistage rapide.

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique
CHU: Centre hospitalo-universitaire
dNTP ; désoxyribonucléotides triphosphates
MgCl₂ ; Chlorure de magnésium
OMS : Organisation Mondiale de la santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
P.: Plasmodium
SPSS : Statistique Package for Social Science

REFERENCES

1. Organisation Mondiale de la Santé. Report on the Malaria Coordination Meeting in North Africa. Genève: OMS; 1997.
2. Aoun K, Siala E, Tchibkere D, Abdallah RB, Zallagua N, Chahed MK, et al. Paludisme d'importation en Tunisie : conséquences sur le risque de réintroduction de la maladie. *Med Trop (Mars)*. févr 2010;70(1):33.
3. Mukadi P, Gillet P, Lukuka A, Atua B, Kahodi S, Lokombe J, et al. External quality assessment of malaria microscopy in the Democratic Republic of the Congo. *Malar J*. 18 oct 2011;10(1):308.
4. Steenkeste N, Incardona S, Chy S, Duval L, Ekala MT, Lim P, et al. Towards high- throughput molecular detection of plasmodium: New approaches and molecular markers. *Malar J*. 2009;8:1-12.
5. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of plasmodium parasites. *Methods Mol Med*. 2002;72:189-203.
6. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. oct 1993;61(2):315-20.
7. Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval JF. Contribution of PCR- based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Med Trop Rev Corps Sante Colon*. 2005;65(2):176-83.
8. Siala E, Abdallah RB, Bouratbine A, Aoun K. Actualités du diagnostic biologique du paludisme current biological diagnosis of malaria. *Rev Tunis Infect*. 2010;4:5-9.
9. Siala E, Essid R, Smiri M, Doggui A, Ben Sghaier I, Aoun K, et al. Contribution of Polymerase Chain Reaction for detection of malaria in Tunisia. *Tunis Med*. déc 2015;93(12):766-70.
10. Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Krudsood S, Leowattana W, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. nov 2005;73(5):850-4.
11. Paglia MG, Vairo F, Bevilacqua N, Ghirga P, Narciso P, Severini C, et al. Molecular diagnosis and species identification of imported malaria in returning travellers in Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 févr 2012;72(2):175-80.
12. Turki H, Raeisi A, Malekzadeh K, Ghanbarnejad A, Zoghi S, Yeryan M, et al. Efficiency of nested-PCR in detecting asymptomatic cases toward malaria elimination program in an endemic area of Iran. *Iran J Parasitol*. 2015;10(1):39-45.
13. Kang JM, Cho PY, Moe M, Lee J, Jun H, Lee HW, et al. Comparison of the diagnostic performance of microscopic examination with nested polymerase chain reaction for optimum malaria diagnosis in Upper Myanmar. *Malar J*. 16 mars 2017;16(1):119.
14. Golassa L, Enweji N, Erko B, Aseffa A, Swedberg G. Detection of a substantial number of sub-microscopic Plasmodium falciparum infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malar J*. 3 oct 2013;12:352.
15. Boreux R, Mvumbi DM, Mvumbi GL, Situakibanza HNT. Diagnostic du paludisme severe : comparaison de la technique de PCR en temps reel versus microscopie; a Kinshasa; Republique Democratique du Congo. *Ann Afr Méd En Ligne*. 2016;204-2051.
16. Marangi M, Di Tullio R, Mens PF, Martinelli D, Fazio V, Angarano G, et al. Prevalence of Plasmodium spp. in malaria asymptomatic African migrants assessed by nucleic acid sequence based amplification. *Malar J*. 12 janv 2009;8:12.
17. Mukomena SE, Philipe CM, Désiré MK, Pascal LT, Ali MM, Oscar LN. Parasitémie asymptomatique chez les enfants de moins de 5 ans, enfants en âge scolaire et prise en charge des épisodes fébriles dans les ménages de Lubumbashi, République Démocratique du Congo. *Pan Afr Med J*. 27 mai 2016;24:94.
18. Organisation Mondiale de la Santé. Administration de masse de médicaments contre le paludisme à falciparum : Manuel pratique. Genève: OMS; 2020.
19. Tabbabi A, Alkische AA, Samy AM, Rhim A, Peterson AT. Malaria in North Africa: A Review of the Status of Vectors and Parasites. *J Entomol Sci*. 1 janv 2020;55(1):25-37.
20. WHO/Europe | Home [Internet]. [cité 9 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.euro.who.int/en>
21. Belhadj S, Menif O, Kaouech E, Anane S, Jeguirim H, Ben Chaabane T, et al. Le paludisme d'importation en Tunisie : bilan de 291 cas diagnostiqués à l'hôpital La Rabta de Tunis (1991-2006). *Rev Francoph Lab*. 1 févr 2008;2008(399):95-8.
22. M.Chelaifa, R. Besrou, Mtibaa. Paludisme d'importation en Tunisie : bilan des cas diagnostiqués à l'hôpital militaire de Tunis (2012-2020). *Pan Afr Med J Conf Proc [Internet]*. 2021 [cité 28 mai 2022];1. Disponible sur: <https://www.proceedings.panafrican-med-journal.com/conferences/2017/4/34/abstract/>
23. Mtibaa L, Siala E, Bouhlel S, Abda IB, Abdallah RB, Zallega N, et al. Le paludisme d'importation en Tunisie: bilan des cas diagnostiqués à l'Institut Pasteur de Tunis (2008- 2016). *Pan Afr Med J*. 2017;4(34):17
24. Lekweiry KM, Salem MSOA, Basco LK, Briolant S, Hafid J, Boukhary AOMS. Malaria in Mauritania: retrospective and prospective overview. *Malar J*. déc 2015;14(1):100.
25. Perera R, Wickremasinghe R, Newby G, Caldera A, Fernando D, Mendis K. Malaria Control, Elimination, and Prevention as Components of Health Security: A Review. *Am J Trop Med Hyg*. 2022; 107(4):747-753